

109

Circular Técnica

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2008

Autores

Andrea Almeida Carneiro¹
Ph.D Biologia Molecular Embrapa Milho
e Sorgo. Cx. P 151. 35701-970 Sete
Lagoas, MG
andreac@crpms.embrapa.br

Eliane Aparecida Gomes¹
Doutora Microbiologia –
eliane@crpms.embrapa.br

Emanuelle Tais da Silva Souza
Bióloga-Unifem - Centro Universitário
de Sete Lagoas – Sete Lagoas-MG.
manuataouza@yahoo.com.br

Gracielle T. da C. P. Coelho²
Doutora Fisiologia Vegetal
UFPA – Universidade Federal de Lavras
– C.P. 3037. 37200-000 – Lavras-MG
gracielle.costa@gmail.com

Ivanildo Evódio Marriel¹
Doutor Microbiologia –
emariel@crpms.embrapa.br

Maira de F. Pereira-Biotecnóloga
mairabiotec@yahoo.com.br

Maria José Vilaça Vasconcelos¹
Ph.D. Biologia Molecular –
mjose@crpms.embrapa.br

Maria Tereza Santos de Oliveira
Engenheira Florestal –
kekant@yahoo.com.br

Newton Portinho Carneiro¹
Ph.D Biologia Molecular –
newtonc@crpms.embrapa.br

Patrícia Gomes da Silva²
Mestre Biotecnologia Vegetal
patricia.bio1@yahoo.com.br



Fungos mineralizadores de fitato isolados da rizosfera de milho

Introdução

A aquisição de fósforo (P) é primordial para o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais, desempenhando importantes papéis em funções fisiológicas básicas (Raghothama, 1999). Entretanto, P é um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento de plantas, embora seja abundante no solo tanto na forma orgânica (Po) quanto na inorgânica (Pi) (Gyaneshwar et al., 2002). A escassez é devido ao fato deste mineral ter uma difusão muito pequena na maioria dos solos, seus íons serem altamente reativos com numerosos constituintes do solo (Hinsinger, 2001) e as plantas utilizarem este nutriente quase que exclusivamente na forma de ânions de fosfato, principalmente HPO_4^{2-} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$. Apenas uma pequena quantidade destes íons, entre 0,1 e 10 μM (Raghothama, 1999; Frossard et al., 2000), está disponível na fase líquida do solo. Para manter um crescimento saudável, plantas necessitam, no mínimo, entre 5 e 60 μM de P, dependendo da espécie (Föhse et al., 1988). Estima-se que 5,7 bilhões de hectares ao redor do mundo contenham quantidades insuficientes de P para um ótimo crescimento de lavouras (Batjes, 1997).

Para resolver o problema da deficiência de P e manter um ótimo rendimento agrícola, mais de 30 milhões de toneladas de fertilizantes fosfatados por ano são adicionados aos solos no mundo inteiro (IFIA, 2006). Baseado no atual consumo de fertilizantes fosfatados estima-se uma durabilidade de, no máximo, 90 anos para as fontes de P utilizadas para a produção de suprimentos agrícolas (Güsewell, 2004; Lenton, 2001; Raghothama, 1999). A produção de fertilizantes químicos fosfatados é um processo altamente energético custando em torno de quatro bilhões de dólares por ano para atender às necessidades globais (Goldstein et al., 1993). A situação é ainda mais complicada pelo fato de que entre 75% e 90% dos fertilizantes aplicados no solo (Stevenson, 1986) tornam-se rapidamente indisponíveis para a utilização pelas plantas. A ligação destes fertilizantes a cátions e a compostos orgânicos é a causa dessa indisponibilidade. Este acúmulo de fertilizantes fosfatados em regiões agrícolas é potencialmente poluente (Abselson 1999; Miller et al. 2001) e tem causado sérios danos ao meio ambiente. A lixiviação destes fertilizantes gera eutrofização (Raghotama, 1999), hipoxia (Vance et al., 2003) e, conseqüentemente, degradação de ecossistemas, principalmente os aquáticos.

O P orgânico representa até 80% do total de P presente nos solos, sendo que 50% deste estão na forma de fitato. Esta forma de P orgânico parece ser utilizada apenas marginalmente pelas plantas (Adams and Pate, 1992; Findenegg & Nelemans, 1993; Hayes et al., 2000; Richardson et al., 2000). Associação de micro-organismos e plantas ao nível da rizosfera é de

fundamental importância para aumentar a hidrólise do fitato e, conseqüentemente, disponibilizar uma maior quantidade de P para as plantas.

A cultura do milho

O milho (*Zea mays*) é um dos cereais mais produzidos no mundo, sendo que o Brasil é o terceiro maior produtor, com 51.830.670 toneladas do grão na safra de 2007 (IBGE, 2008). O milho é um cereal cuja cultura vem crescendo extensamente no mundo. Hoje, trata-se da forragem mais importante entre os cereais, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento. Sua utilização na alimentação é bem diversificada devido ao alto conteúdo de amido (71,5%) e teores significativos de proteínas (10,3%), lipídeos (4,8%) e açúcares (2,%) (Lopes, 2005).

Milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais do mundo dependem do milho para sua subsistência. Nestas áreas, a produtividade das colheitas é frequentemente baixa. As principais causas são estresses bióticos, abióticos e limitações nutricionais (O'Connor-Sanchez et al., 2002).

A limitação da terra produtiva, os recursos de água, os estresses ambientais e o grande crescimento da população ocasionam uma grande demanda no aumento da produção de milho, bem como na sua qualidade (Huang & Wei, 2004). O grande desafio para a elevação do rendimento agrícola e o aumento da competitividade do milho produzido no Brasil é o ajuste de sistemas de produção, de forma a gerar melhorias na produtividade. Dentre as melhorias necessárias, podem ser citadas a produção de grãos com maior resistência a pragas e a doenças e mais tolerantes a diferentes estresses bióticos e abióticos. Entre os estresses minerais ou nutricionais que mais

comprometem a produtividade do milho destacam-se as deficiências de fósforo e nitrogênio. A aquisição de fósforo é primordial para o crescimento e o desenvolvimento da planta. Plantas absorvem fosfato apenas na forma inorgânica (Pi). No entanto, o Pi é um dos nutrientes que raramente se apresenta no solo em quantidades necessárias requeridas pelas plantas devido à sua ligação a cátions e a compostos orgânicos. O P ligado a compostos orgânicos representa até 80% do total de P presente nos solos, sendo que 50% deste estão na forma de fitato.

Fósforo

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento de todos os organismos (Figura 1). Ele está envolvido em funções básicas como na formação de ácidos nucléicos, fosfolipídios, metabolismo energético, ativação de metabolismo intermediário e regulação enzimática através das cascatas de tradução de sinais (Abel et al., 2002; Rausch & Bucher, 2002; Schünmann et al., 2004). Desta forma, a deficiência de P pode ser considerada o maior fator limitante para o desenvolvimento de plantas em ecossistemas naturais. Para garantir a sobrevivência em solos com baixas concentrações de P, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de adaptação (Muchal, 1999; Karthikeyan et al., 2002).

Estes mecanismos de adaptação são observados como modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, tais como modificações na anatomia da raiz, acúmulo de pigmentos de antocianina, secreção de fosfomonoesterases e ácidos orgânicos na rizosfera (Fan et al., 2003; Ligaba et al., 2004; Lopez-Bucio et al., 2000; Rausch & Bucher, 2002). A assimilação, armazenamento e metabolismo do P são processos altamente regulados que afetam diretamente o crescimento,

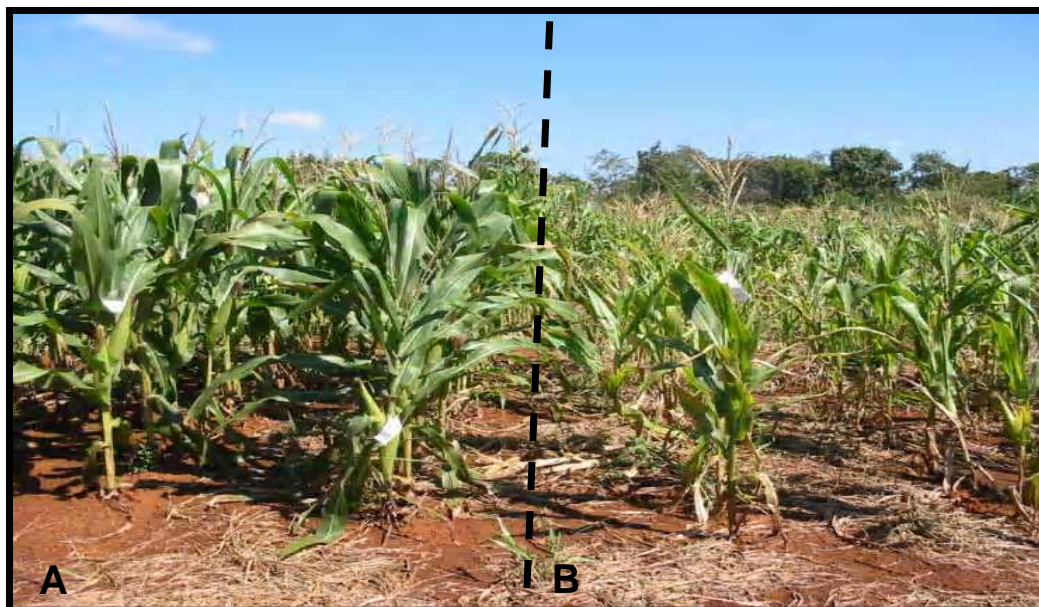


Figura 1. Utilização de P por diferentes genótipos de milho. (A) Genótipo eficiente; (B) Genótipo ineficiente.

o desenvolvimento e, conseqüentemente, a produção da planta (Abel et al., 2002).

A deficiência de P pode gerar diversos distúrbios metabólicos que levam à queda da produtividade e até à inviabilidade da cultura. Wasaki et al. (2003) enumeram estas mudanças metabólicas como (1) aceleração da provisão de carbono para síntese de ácidos orgânicos por meio da glicólise, (2) alterações do metabolismo de lipídio, (3) remobilização de fosfolipídios da parede celular e (4) mudanças de expressão de genes relacionados à resposta para elementos metálicos, como o Al, Fe e Zn.

Para promover um aumento de produtividade agrícola, grandes quantidades de fertilizantes fosfatados são aplicadas nestas áreas a cada ano, mas somente 10% a 20% do total são prontamente utilizados pelas plantas (Holford, 1997). O uso indiscriminado de fertilizantes fosfatados vem aumentando progressivamente desde 1960 (Vance et al., 2003). Se o aumento do consumo de adubos fosfatados continuar acontecendo, prevê-se que as fontes de Pi se

esgotem até 2050 (Güsewell, 2004; Lenton, 2001; Raghotama, 1999; Vance et al., 2003).

O P total é acumulado na natureza nas formas orgânica (Po) ou inorgânica (Pi). Pi no solo ocorre na forma de ânions de fosfato, os quais em solos ácidos são altamente reativos com os óxidos de ferro (Fe), alumínio (Al) e silicatos de alumínio, enquanto que em solos alcalinos formam precipitados pouco solúveis com carbonatos de cálcio (Ca) (Sanyal & De Datta, 1991). Em regiões tropicais e subtropicais as características geoquímicas do solo favorecem uma maior retenção dos íons de fosfato pelos constituintes sólidos do solo.

O P orgânico compreende entre 20% e 80% do total de P presente nos solos (Bielecki 1973; Dalal, 1977). Os principais componentes de P orgânico no solo, identificados por ressonância magnética (RNM^{31}P), são os ortofosfatos de monoésteres $[\text{RO-PO}]$, os ortofosfatos de diésteres $[\text{R-O-PO}_2\text{-O-R}']$ e os fosfonatos $[\text{R-PO}_3]$. Os ortofosfatos de monoésteres são as formas predominantes de P orgânico em extratos de solos (Guggenberger et al., 1996; Magid et al., 1996), sendo que o principal componente são os

fosfatos de inositol (ésteres de hexaidroxibenzeno), desde mono até hexafosfato de inositol (Figura 2). De particular importância é a ocorrência no solo de P orgânico na forma de ácido hexafosfático de *myo* inositol ou fitato, provavelmente devido a maior estabilidade dessa forma no solo.

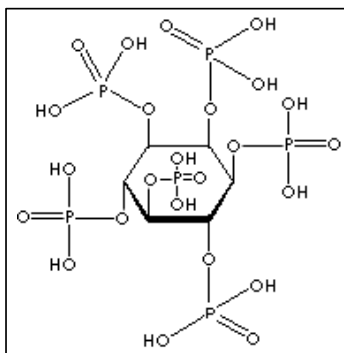


Figura 2. Ácido Fítico

Muitas plantas são beneficiadas, sob a deficiência em P, pela associação com micro-organismos. Esta associação pode resultar em um melhor acesso ou disponibilização para as plantas de fontes de P insolúveis. O envolvimento de micro-organismos na solubilização de fosfatos inorgânicos é conhecido há bastante tempo, desde 1903 (Kucey et al., 1989). Micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSP) estão presentes em diversos ambientes e seu número é bastante variável. Nos solos, bactérias solubilizadoras de fosfato constituem 1-50% e fungos, 0.5-0.1% do total da população. Em geral, bactérias solubilizadoras de P estão em maior número do que os fungos (Banik e Dey, 1982; Kucey, 1983; Kucey et al., 1989). A maioria dos MSP solubilizam complexos de Ca-P e apenas poucos podem solubilizar Fe-P e Al-P (Kucey et al., 1989). A capacidade dos MSP de solubilizar complexos de Ca-P tem sido atribuída à sua habilidade de reduzir o pH pela liberação de ácidos orgânicos ou prótons. Os ácidos orgânicos secretados podem diretamente dissolver o fosfato mineral ou quelar íons de Fe ou Al associados com o fosfato. Entretanto, acidificação não parece ser o único mecanismo de solubilização, pois a habilidade de reduzir o pH

em alguns casos não está correlacionada com a habilidade de solubilizar fosfato mineral (Subba Rao, 1982)

Fitases

Fitatos representam até 60% do total de P orgânico no solo (Mudge et al. 2003; Iyamuremye & Dick 1996; Dalal, 1977). Entretanto, esta forma de P orgânico, parece ser utilizada apenas marginalmente pelas plantas (Adams and Pate, 1992; Findenegg & Nelemans, 1993; Hayes et al., 2000; Richardson et al., 2000).

Fosfatases são requeridas para a hidrólise de formas orgânicas de fosfato presentes no solo e liberação do Pi (Raghothama, 1999). Uma grande variedade de fosfatases com diferentes especificidades tem sido caracterizadas em raízes de plantas (Tandano & Sakai, 1991) e micro-organismos do solo (Richardson, 1994). Estas incluem as fitases (*myo*-inositol hexaphosphate phosphohydrolases) que são enzimas que pertencem à família das fosfatases ácidas e compartilham uma sequência aminoácídica padrão [LIVM]-X-X-[LIVMA]-X-X-[LIVM]-X-R-H-[GN]-X-R-X-[PAS]. Fitases são capazes de catalisar a hidrólise de ligações fosfomonoéster do fitato (saís de *myo*-inositol hexaphosphate ou *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexadihydrogen phosphate), criando formas menos complexas de *myo*-inositol fosfato e fosfato inorgânico. Fitases são agrupadas de acordo com a posição do grupo fosfato ester na molécula do fitato, onde a hidrólise enzimática é iniciada, como 3-fitase (EC 3.1.3.8) de micro-organismos ou 6-fitases (EC3.1.3.26) de plantas (Wodzinski & Ullah, 1996).

No estudo das fitases muita atenção tem sido dada ao seu uso como um aditivo na ração animal porque o fitato presente nas sementes de plantas não é digerido pelos animais monogástricos (revisado por Wodzinski and Ullah 1996; Brinch-Pedersen et al. 2000). Entretanto, a contribuição de fitases provenientes de raízes ou de micro-organismos do solo para a nutrição de

plantas permanece pouco entendida. Um aumento da atividade de fosfatases em resposta à deficiência de Pi e altos níveis de atividade dentro da rizosfera, comparado com o restante do solo, são percebidos como evidências para o envolvimento destas enzimas na nutrição de plantas (Hayes et al., 1999; Hubel & Beck, 1996; Li et al., 1997).

Utilização de fitato pelas plantas e micro-organismos da rizosfera

Para se tornar disponível para as plantas, o P orgânico precisa ser desfosforilado por fosfatases porque as plantas utilizam o fosfato apenas na forma inorgânica (Pi) (Richardson, 2001). O solo presente na vizinhança das raízes – denominado de rizosfera – é caracterizado como uma área de alta densidade microbiana, sendo a estimulação do crescimento microbiano pelas raízes comumente conhecido como efeito rizosfera. Na rizosfera, substâncias orgânicas (açúcares, ácidos orgânicos, polissacarídeos etc) são exudadas da raiz para o solo, onde são utilizados pelos micro-organismos como fontes de carbono e energia para o crescimento e reprodução (Whipps, 1990). A atividade de fosfatases é alta na rizosfera, tornando esta área uma zona de degradação e consumo de P orgânico, principalmente fitatos (Tarafdar and Jungk, 1987). Em geral, muitas espécies de plantas não utilizam o fitato como uma fonte de P porque não possuem uma fitase extracelular; em *Arabidopsis thaliana*, fitase constitui menos de 0,8% da atividade total de fosfomonoesterase ácidas presente nas raízes e não foi detectada como uma enzima extracelular (Richardson et al., 2000). Entretanto, quando fitases (Hayes et al., 2000; Richardson et al., 2000; Idriss et al., 2002) são adicionadas ao meio de crescimento, plantas são capazes de crescer, *in vitro*, utilizando fitato como única fonte de P.

Embora bactérias que utilizem o ácido fítico (Na-IHP) possam ser encontradas tanto em solos cultivados como em solos alagados, pastagens e florestas (Richardson and Hadobas, 1997), a utilização do fitato, presente no solo, pelas

plantas e micro-organismos é geralmente limitada. Pouca informação existe relacionando micro-organismos produtores de fitase, presentes na rizosfera, e o crescimento vegetal.

Uma equipe multidisciplinar da Embrapa Milho e Sorgo vêm isolando e caracterizando molecularmente micro-organismos, obtidos a partir de amostras de solo rizosférico de plantas de milho cultivadas no Cerrado, capazes de mineralizar o fitato. O objetivo deste estudo é a utilização eficiente destes micro-organismos ou de seus genes para a geração de novas tecnologias, que reduzirão o custo da produção e o impacto ambiental da atividade agrícola.

Amostragem do solo da rizosfera de milho

Raízes de plantas de milho crescidas em áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas-MG) têm sido coletadas 60 dias após a germinação. Solo da rizosfera é coletado de acordo Ishizawa et al. (1957) de plantas escolhidas ao acaso; as raízes são removidas do campo e imersas em bekers contendo água estéril. Depois de 20 minutos, elas são transferidas para novos recipientes e gentilmente sacudidas para remover o solo restante; esta suspensão de solo aderido às raízes representa o solo rizosférico. De cada amostra, diluições seriadas de 10X são preparadas utilizando uma solução de 0,9% NaCl.

Isolamento de fungos da rizosfera capazes de utilizarem fitato

O meio para o isolamento de micro-organismos capazes de utilizarem fitato (Na-IHP - ácido fítico: Inositolhexaphosphoric acid dodecasodium sal extraído do arroz, Sigma) como fonte de nutrientes foi o desenvolvido por Richardson & Hadobas (1997), que contém (por litro) 10 g Na-IHP, 1.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.0 g KCl, 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mL 0.1 M FeNa-EDTA, 1.0 mL solução de elementos traço (por litro: 15.0 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.43 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.24 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.99 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.19 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g H_3BO_3 , 1.5% agar e 0.01 g l^{-1} bromocresol green como um indicador de pH.

Para isolar os micro-organismos capazes de utilizar Na-IHP, diferentes quantidades das diluições são plaqueadas no meio de cultivo descrito. A capacidade dos micro-organismos de utilizarem fitato é estimada pela sua capacidade de crescimento em meio sólido e líquido contendo quantidade limitante de fitato (1mM Na-IHP). Neste trabalho já foram isolados, de meio sólido contendo fitato, 85 fungos (Figura 3). Observou-se que apenas 32,5% dos fungos foram capazes de crescer no meio de cultivo líquido. De acordo com Gargova et al. (1997), micro-organismos quando cultivados em meio sólido podem produzir diversos ácidos que diminuem o pH nas proximidades das colônias, resultando na liberação de uma quantidade de fósforo suficiente para o crescimento microbiano e, portanto, independente de atividade de fitase microbiana. Ademais, Richardson & Hadobas (1997) sugeriram que o número de micro-organismos determinados usando crescimento microbiano apenas em meio sólido é superestimado com relação à proporção de micro-organismos que realmente utilizam fitato. Segundo estes autores, é possível que esta discrepância seja, em parte, devido à presença no ágar de pequenas quantidades de Pi.



Figura 3. Fungos crescendo em meio de cultivo utilizando fitato como única fonte de P.

Caracterização molecular dos fungos capazes de utilizarem fitato

Para a caracterização molecular DNA total dos fungos isolados é amplificado utilizando os primers universais para rDNA ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). As amplificações são realizadas empregando-se 25 ng de DNA genômico, 2,5 M de MgCl_2 , 0,2 μl de Taq DNA polimerase (Invitrogen²), 1,0 μl de dNTP, 50mM de KCl, 10mM Tris-HCl e 0,2 mM de cada oligonucleotídeo. A reação é realizada em termociclador modelo (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, seguido o ciclo de desnaturação 95°C por 30 segundos, 46°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, durante 25 ciclos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação são separados por eletroforese a 100 Volts por 2 horas, em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). As bandas amplificadas para os diversos fungos são eluídas do gel utilizando o kit Gene Clean (Q-Bio Gene – USA). O sequenciamento dos fragmentos amplificados é feito em um sequenciador automático ABI 3100. As sequências obtidas são analisadas e comparadas com sequências depositadas no GenBank Nucleotide Database utilizando os programas BLAST e Clustal 1.6 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Dentre os fungos já sequenciados, neste trabalho, foram encontrados mineralizadores de fitato dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Paecilomyces*, *Talaromyces*, *Mucor* e *Fusarium*.

Estudos de isolamento e caracterização de diferentes grupos de micro-organismos que possuem atividade de fitase têm sido publicados. Gargova et al. (1997) avaliaram 203 fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus* e selecionaram uma espécie de *Aspergillus* com alta eficiência de produção de fitase extracelular.

Com base nos resultados preliminares apresentados é possível concluir que a rizosfera

do milho é colonizada por fungos capazes de utilizar fitato como fonte de P e que estes microrganismos poderão, futuramente, ser utilizados como inoculantes, fontes de genes ou de enzimas para o bioprocessamento de fontes orgânicas de P.

Referências Bibliográficas

- ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. (2002). Phosphate sensing in higher plants *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 1-8.
- ABELSON P. H. (1999) A potential phosphate crisis. *Science* 283:2015.
- ADAMS, M.A. AND PATE, J.S. (1992) Availability of organic and inorganic forms of phosphorus to lupins (*Lupinus* spp.). *Plant Soil*, 145, 107-113.
- BANIK S., DEY BK. (1982) Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing bacteria. *Plant soil* 69:353-364.
- BATJES, N.H. (1997). A world data set of derived soil preparation by FAO-UNESCO soil unit global modeling. *Soil Use Manage.* 13, 9-16.
- BIELESKI R.L. (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24:225-252
- BRINCH-PEDERSEN, H., OLESEN, A., RASMUSSEN, S.K. AND HOLM, P.B. (2000) Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus phytase*. *Mol. Breeding*, 6, 195-206.
- DALAL, R.C. (1977) Soil organic phosphorus. *Adv Agron* 29:83-117.
- FAN, M.; ZHU, J.; RICHARDAS, C.; BROW, K. M.; LYNCH, J. P. (2003). Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. *Functional Plant Physiology*, 30, 1-14.
- FINDENEGG, G.R. AND NELEMANS, J.A. (1993) The effect of phytase on the availability of phosphorus from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant Soil*, 154, 189-196.
- FÖHSE, D., CLAASSEN, N., JUNGK, A. (1988). Phosphorus efficiency of plants. I. External and internal requirement and P uptake efficiency of different plant species. *Plant Soil* 110: 101-109.
- FROSSARD, E., CONDRON, L.M., OBERSON, A., SINAJ, S., FARDEAU, J.C. (2000). Process governing phosphorus availability in temperate soils. *J. Environ. Qual.* 29, 12-53.
- GARGOVA, S.; ROSHKOVA, Z.; VANCHEVA, G. (1997) Screening of fungi for phytase production. *Biotechnology Techniques*, v. 11, p. 221-224.
- GOLDSTEIN, A.H., ROGERS R.D., MEAD, G. (1993). Mining by microbe. *Bio/Technol.* 11:1250-1254
- GÜSWELL, S. N (2004). P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytologist*, Oxford, v. 164, p. 243-266.
- GYANESHWAR, P., KUMAR, G.N., PAREKH L.J., POOLE, P.S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245:83-93.
- GUGGENBERGER, G., HAUMAIER, L., THOMAS, R.J., ZECH, W. (1996) Assessing the organic phosphorus status of an oxisol under tropical pastures following native savanna using ³¹P NMR spectroscopy. *Biol. Fertil. Soils* 23:332-339.
- HAYES, J.E., RICHARDSON, A.E., SIMPSON, R.J. (1999) Phytase and acid phosphatase activities in extracts from roots of temperate pasture grass and legume seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.* 26, 801-809.
- HAYES, J.E., SIMPSON, R.J., AND RICHARDSON, A.E. (2000) The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant Soil* 220: 165-174.

- HINSINGER, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195.
- HOLFORD ICR (1997) Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Aust J Soil Res* 35:227-239.
- HUANG, X. Q.; WEI, Z. M (2004). . High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). *Plant Cell Reportes*, New York, v. 22, p. 793-800.
- HUBEL, F.; BECK, E. (1996) Maize root phytase. Purification, characterization and localization of enzyme activity and its putative substrate. *Plant Physiol.* 112, 1429-1436.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). (2008) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200810_5.shtm >. Acesso em: 24 nov.
- IDRISS, E.E., MAKAREWICZ, O., FAROUK, A., ROSNER, K., GREINER, R., BOCHOW, H., ET AL. (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148: 2097-2109.
- IFIA (2006) International Fertilizer Industry Association (<http://www.fertilizer.org>)
- ISHIZAWA, S., SUZUKI, T., SATO, O., AND TOYODA, H. (1957) Studies on microbial population in the rhizosphere of higher plants with special reference to the method of study. *Soil Plant Food* 3: 85-94.
- IYAMUREMYE F, DICK RP (1996) Organic amendments and phosphorus sorption by soils. *Adv Agron* 56:139-185.
- KARTHIKETYAN, A. S.; VARADARAJAN, D. K.; MUKATIRA, U. T.; D'USZO, M. P.; DAMZ, B.; RAGHOTAMA, K. G. (2002). Regulated Expression of Arabidopsis Phosphate Transporters1. *Plant Physiology*, Rockville, v. 130, n. 1, p 221-233.
- KUCEY R.M.N. (1983) Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Albreta soils. *Can. J. Soil. Sci.* 63:671-678.
- KUCEY R.M.N., JENSEN H.H., LEGGETT M.E. (1989) Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *Adv. Agron.* 42:199-228.
- LENTON, T. M.(2001). The role of land plants, phosphorus weathering and are in the rise and regulation of atmospheric oxygen. *Global Change Biology*, Oxford, v. 7, n. 6, p. 613-629.
- LI, M., OSAKI, M., RAO, I.M. AND TADANO, T. (1997) Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant Soil*, 195, 161-169.
- LIGABA, A.; SHEN, H.; SHIBATA, K.; YAMAMOTO, Y.; TANAKAMARU, S.; MATSUMOTO, H. (2004). The role of phosphorus in aluminium-induced citrate and malate exudation from rape (*Brassica napus*). *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 120, n. 4, p. 575-584.
- LOPES, M. J. C. (2005). Estresse oxidativo e análise anatômica em plantas de diferentes ciclos de seleção do milho 'Saracura BRS-4154' sob encharcamento contínuo. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LOPÉZ-BUCIO, J.; NEITO-JACOBO, M. F.; RAMÍREZ-RODRÍGUES, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. (2000). Organic Acid Metabolism in Plants: From Adaptive Physiology to Transgenic Varieties for Cultivation in Extreme Soils. *Plant Science*, Clare, v. 160, n. 1, p. 1-13.
- MAGID, J., TIESSEN H., CONDRON, L.M. (1996) Dynamics of organic phosphorus in soils under natural and agricultural ecosystems. New York, Elsevier Science B.V.

- MILLER SS, LIU J, ALLAN DL, MENZHUBER CJ, FEDOROVA M, VANCE CP (2001) Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. *Plant Physiol* 127:594–606
- MUCHHAL, U. S.; RAGHOTAMA, K. G. (1999). Transcriptional Regulation of Plant Phosphate Transporters. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 96, n. 10, p. 5868-5872.
- MUDGE SR, SMITH FW, RICHARDSON AE (2003) Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. *Plant Sci* 165:871–878.
- O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDEZ-MELARA, M.; TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P.; PONS-HERNÁNDEZ, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. (2002). Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. *Plant Cell Reporters*, New York, v. 21, n. 4, p. 302-312.
- RAGHOTAMA, K.G. (1999) Phosphate acquisition. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 50, 665-693.
- RAUSCH, C.; BUCHER, M. (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, New York, v. 216, n. 1, p. 23-37.
- RICHARDSON, A.E. (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust J Plant Physiol* 28: 897–906.
- RICHARDSON AE, HADOBAS PA, HAYES JE (2000) Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell Environ* 23:397–405
- RICHARDSON, A.E., AND HADOBAS, P.A. (1997) Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol* 43: 509–516.
- RICHARDSON, A.E. (1994) Soil microorganisms and phosphorus availability. In *Soil Biota Management in Sustainable Farming Systems* (Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. and Grace, P.R., eds). Melbourne, Australia: CSIRO, pp. 50-62.
- SANYAL S.K., DE DATTA S.K. (1991). Chemistry of phosphorus transformation in soil. *Advances in soil science* 16:1-120.
- SCHÜNEMANN, P. H. D.; RICHARDSON, A. E.; SMITH, F. W.; E DELHAIZE, E. (2004). Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 55, n. 398, p. 855-865.
- STEVENSON, F.J. (1986). Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur micronutrients. Wiley New York.
- SUBBA RAO N.S. (1982) *In* *Advances in Agricultural Microbiology*. Ed. N.S. Subba Rao. Pp. 229-305. Oxford and IBH Publ. Co.
- TANDANO, T. AND SAKAI, H. (1991) Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutrit.* 37, 129-140.
- TARAFDAR, J.C., AND JUNGK, A. (1987) Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biol Fert Soils* 3: 199–204.
- VANCE CP, UHDE SC, ALLAN DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* 157:423–447.

WASAKI, J.; YONETANI, R.; KURODA, S.; SHINANO, T.; YAZAKI, J.; FUJII, F.; SHIMBO, K.; YAMAMOTO, K.; SAKATA, K.; SASAKI, T.; KISHIMOTO, N.; KIKUCHI, S.; YAMAGISHI, M.; OSAKI, M. (2003). Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1515-1523.

WHIPPS, J.M. (1990) Carbon economy. In *The Rhizosphere*. Lynch, J.M. (ed.). John Chichester, West Sussex, UK:Wiley & Son, pp. 59–97.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.) **PCR Protocols**. Academic Press, New York,. p.315-322.

WODZINSKI, R.J.; ULLAH, A.H.J. (1996) Phytase. *Advan. Appl.Microbiol.* 42, 263-302.

Circular Técnica, 109

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 151
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2008): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino
Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães
Membros: Andrea Almeida Carneiro, Carlos Roberto Casela, Cláudia T. Guimarães, Clelio Araujo, Flavia França Teixeira, Jurandir Vieira Magalhães

Expediente

Revisão de texto: Clelio Araujo
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa